

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23688009

研究課題名(和文) イネの節における選択的ミネラル分配機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of preferential mineral distribution in rice node

研究代表者

山地 直樹 (Yamaji, Naoki)

岡山大学・その他部局等・助教

研究者番号：00444646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,300,000円、(間接経費) 6,090,000円

研究成果の概要(和文)：イネ科植物は「節」において複数の維管束系を著しく発達させ、根から吸収した無機栄養素の新葉や種子への優先的な分配を実現しているが、その分子機構は解明されていなかった。本研究ではイネ節で働く亜鉛、銅、マンガンの輸送体タンパク質を同定し、元素毎に異なる特徴的な分配様式に大きく寄与していることを明らかにした。これらはイネ科植物の生長戦略上の重要な新知見であるとともに、穀物の生産性・安全性・栄養価の向上に応用できる。

研究成果の概要(英文)：Remarkably developed vascular systems in nodes of grass plants play a pivotal role for preferential distribution of mineral nutrients to the developing young leaves and grains, although the molecular basis were not understood. In this research, transporters for Zn, Cu and Mn in rice nodes were identified and the important contributions to the distinct distribution pathways for each element were unraveled.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養・土壌学

キーワード：植物栄養代謝 トランスポーター 節 イネ ミネラル

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

イネ科植物は節において複数の維管束系を著しく発達させ、根から吸収したミネラルの新葉や茎頂、特に穂への優先的な分配を実現している。生理学実験や放射性トレーサを用いた実験から、少なくとも鉄・亜鉛・カドミウムなどのミネラルに関して、節までは速やかに上昇するが、いったん節に滞留し、蒸散の多い展開葉ではなく未展開葉や穂へと優先的に輸送されることが知られている。このような節における優先的な分配には、節の維管束の配向や形態的特徴などから、“肥大維管束”から“分散維管束”への維管束間輸送経路が推定されていたが、分子・遺伝子レベルの知見はほとんど無く、節における輸送体分子の役割を実証した研究は代表者らのケイ酸輸送体 Lsi6 の研究がほとんど唯一の例であった。

2. 研究の目的

本研究ではイネ節の選択的ミネラル分配に関わる輸送体遺伝子の同定と機能解析(3元素4遺伝子程度)を行うことによって、これまでブラックボックスであったイネ科作物の節の機能を遺伝子・タンパク質レベルで明らかにすることを第一の目的とする。また、節のミネラル分配機構において最も重要な役割を果たすと考えられる肥大維管束木部転送細胞や分散維管束における遺伝子発現の制御機構を明らかにするため、木部転送細胞に高発現するケイ酸輸送体 Lsi6 などのプロモーター領域について、組織特異的発現を制御するシス配列および転写調節因子を探索する。

3. 研究の方法

(1) 節の選択的ミネラル分配機構の解明

マイクロアレイおよび定量的 RT-PCR によって見出した、節で高発現する Fe, Zn, Mn, Cu などのミネラル輸送体候補遺伝子について、遺伝子破壊株を検索、取得し、また RNAi 法による発現抑制株を作成する。穂や止葉などのミネラル蓄積を ICP-MS で測定し、アイソトープのパルスラベルを用いた組織レベルでのミネラルの分布の比較などによってそれらの候補遺伝子の節における生理的な役割を明らかにする。また抗体染色やプロモーター-GFP 形質転換イネによって組織局在を、GFP 融合遺伝子とウエスタン解析によって細胞内局在を明らかにする。輸送活性はアフリカツメガエル卵母細胞および酵母発現系を用いてアッセイする。

(2) 節組織特異的プロモーターの開発

節の木部転送細胞に高発現する Lsi6 や新たに同定した遺伝子のプロモーターを用いて、木部転送細胞や分散維管束における遺伝子発現に関わる制御領域を明らかにする。プロ

モーターのデリベーションクローンに GFP レポーターを付けたものを 8 種類程度用意し、形質転換イネにおいて RT-PCR と GFP 蛍光、GFP に対する抗体染色によって組織特異性の変化を確認する。節特異的な転写制御領域が見出された場合は、酵母 one-hybrid 法による転写調節因子のスクリーニングを行う。

4. 研究成果

マイクロアレイ解析等によって節における高発現が明らかになったミネラル輸送体候補遺伝子、OsNramp3、OsHMA2、OsYSL16 について、遺伝子破壊株などを用いた機能解析を行い、いずれもミネラル元素の分配に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

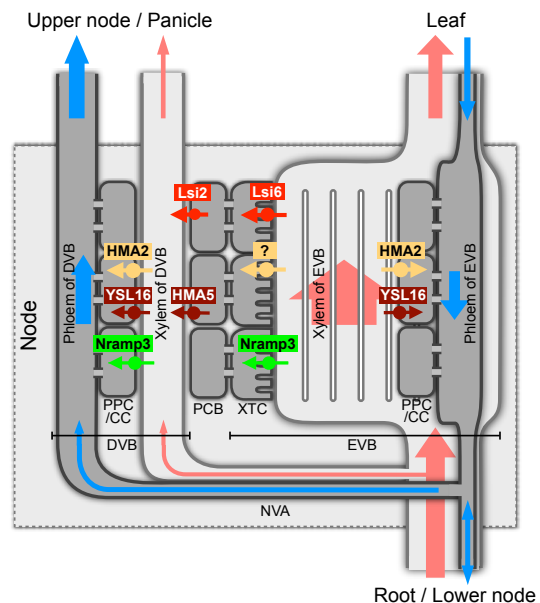


図1 節の輸送体と維管束間輸送経路

(1) OsYSL16 は細胞膜に局在し、銅とニコチアミンの錯体を輸送する。節においては維管束節部に発現し、加えて葉身、葉鞘の維管束にも高発現していた。遺伝子破壊株では下位葉の銅の蓄積が増加し、新葉や穂への銅の分配が減少していた。また下位葉からニコチアミン銅を与えた場合の転流も殆どみられなくなった。これらの結果から、OsYSL16 は葉および節においてニコチアミン銅錯体の節管へのローディングを担う輸送体であり、銅の再転流に必要であることが明らかになった。(図1、発表論文③)

(2) OsHMA2 は細胞膜に局在し、亜鉛およびカドミウムを細胞内に取り込む輸送活性がみられた。免疫組織染色の結果、OsHMA2 タンパク質は節の維管束の節部および根の内鞘細胞に局在していた。Tos17 挿入変異株を用いた解析の結果、根の発現については亜

鉛およびカドミウムの地上部への転流に寄与していた。地上部では、これらの変異株では上位節や新葉、穂への亜鉛およびカドミウムの分配が減少し、逆に下位節や下位葉への分配が増加した。亜鉛およびカドミウムはいずれも一旦節に蓄積した後、専ら発達中の新葉や穂へと優先的に輸送されることが知られており、OsHMA2はこの特徴的な分配様式に必要な、節の維管束節部へのローディングを担うことが明らかになった。(図1、発表論文②)

(3) OsNramp3は細胞膜に局在し、マンガンを細胞内へと輸送する活性がみられた。OsNramp3の発現は主に節において、肥大維管束木部(木部転送細胞など)および分散維管束篩部の両方にみられた。さらに免疫組織染色の結果、マンガン欠乏条件では細胞膜に局在するタンパク質が、マンガン過剰条件では数時間以内に速やかに細胞内の小胞に取り込まれ分解されることを見出した(図2)その結果、マンガン欠乏条件下の野生型株では、限られたマンガンの新葉や穂への優先的な分配が観察されたが、遺伝子破壊株では大半のマンガンが下位葉へと分配され、新葉や穂への分配が著しく減少した。一方でマンガン過剰条件下では野生型株と破壊株の分配様式は一致し、蒸散量に応じて下位葉へと分配された。このように、OsNramp3は環境中のマンガン条件に応じて節の維管束間輸送を調節し、マンガン分配のスイッチとして機能することが明らかになった。(図1、発表論文①)

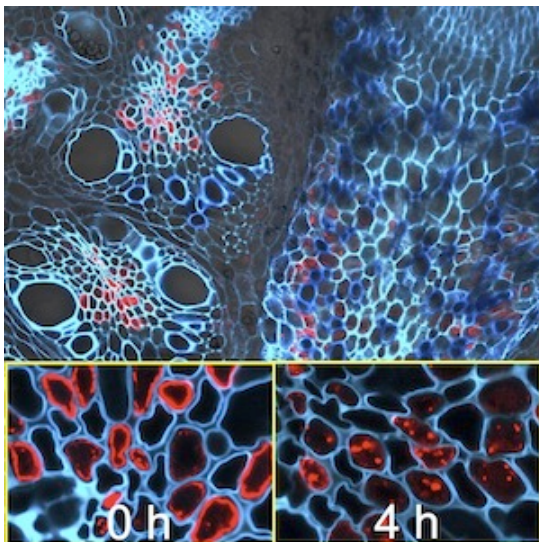


図2 過剰マンガんに応答した OsNramp3 タンパク質(赤色)の分解

(4) この他、鉄および亜鉛の分配に関わる新規輸送体を同定し、解析と学会発表を行っている。

(5) 節のミネラル分配機構において重要な役割を果たすと考えられる肥大維管束周縁部の木部転送細胞における遺伝子発現の制御機構を明らかにするため、木部転送細胞に高発現するケイ酸輸送体 Lsi6 およびマンガン輸送体 OsNramp3のプロモーター解析を行った。異なる長さの上流配列、構造遺伝子領域、3'UTRに GFP レポーターを付加した合計 10 種類のコンストラクトを用いて形質転換イネを作成し、免疫組織染色などによって GFP レポーターの発現部位を調査したところ、一部のコンストラクトでは節以外の組織における発現は内在の遺伝子と一致したが、節の木部転送細胞においてはいずれのコンストラクトでも顕著な発現はみられなかった。この結果から、木部転送細胞における遺伝子発現制御に関わるシス領域は特定できなかったが、他組織とは異なる特異的な発現制御機構の存在が示唆された。

(6) 本研究によって、イネの節で働くミネラル元素の輸送体タンパク質が、元素毎に異なる特徴的な分配様式に大きく寄与していることが明らかになった。これはイネ科植物の生存・成長戦略を理解する上で、これまで見過ごされてきた重要な新知見である。しかしその役割が解明された節の輸送体はまだごく一部であり、ここで明らかになったマンガ、銅、亜鉛、カドミウム以外のミネラル元素についても節において何らかの分配制御が予想されることから、本研究をより一層発展させる必要がある。また、これらの知見に基づき、分子育種や遺伝子工学的手法によって節のミネラル分配を改変すれば、穀物の生産性・安全性・栄養価の向上に応用できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 3件)

① Naoki Yamaji, Akimasa Sasaki, Ji Xing Xia, Kengo Yokosho, Jian Feng Ma (2013) A node-based switch for preferential distribution of manganese in rice. Nature Communications, 4:2442 1-11, DOI:10.1038/ncomms3442 査読有

② Naoki Yamaji, Ji Xing Xia, Namiki Mitani-Ueno, Kengo Yokosho, Jian Feng Ma (2013) Preferential delivery of zinc to developing tissues in rice is mediated by

P-type heavy metal ATPase OsHMA2. *Plant Physiology*, 162: 927-939, DOI: 10.1104/pp.113.216564 査読有

③ Luqing Zheng, Naoki Yamaji, Kengo Yokosho, Jian Feng Ma (2012) YSL16 is a phloem-localized transporter of the copper-nicotianamine complex that is responsible for copper distribution in rice. *The Plant Cell*, 24: 3767-3782, DOI: 10.1105/tpc.112.103820 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

- (1) 山地直樹 他、イネ節における鉄の分配に
関与する輸送体の探索と機能解析、日本植物
生理学会、2014 年 3 月 18-20 日、富山大学
- (2) 佐々木明正 他、イネの節で局在する輸送
体 OsZIP3 は亜鉛の優先的分配に関与する、
日本植物生理学会、2014 年 3 月 18-20 日、
富山大学
- (3) Yamaji, N. et al., Role of node-located
transporters in mineral distribution in rice.
XVII International Plant Nutrition
Colloquium 2013, Aug. 19-22, Istanbul,
Turkey
- (4) 山地直樹 他、イネの節におけるミネラル
の維管束間輸送と分配制御機構、第 8 回トラ
ンスポーター研究会年会、2013 年 6 月 15-16
日、熊本大学
- (5) Yamaji, N. et al., Dynamic regulation of
Mn distribution by OsNramp3 in rice node.
16th International Workshop on Plant
Membrane Biology, 2013, Mar. 26-31,
Kurashiki, Japan
- (6) Yamaji, N. et al., Efficient transport of
Si by Lsi1 and Lsi6 is driven by efflux Si
transporters in rice. 16th International
Workshop on Plant Membrane Biology,
2013, Mar. 26-31, Kurashiki, Japan
- (7) Zheng, L.Q. et al., OsYSL16 is required
for redistribution of Cu from older tissues
in rice. 16th International Workshop on
Plant Membrane Biology, 2013, Mar.
26-31, Kurashiki, Japan
- (8) 山地直樹 他、イネ節の維管束間輸送に働
くケイ酸輸送体、日本植物生理学会、2013
年 3 月 21-23 日、岡山大学
- (9) 鄭録慶 他、イネの銅再転流に関わる輸送
体 OsYSL16 の解析、日本植物生理学会、2013
年 3 月 21-23 日、岡山大学
- (10) Yamaji, N. et al., OsNramp3-mediated
distribution of Mn is controlled by external
Mn supply in rice. The 8th International

Symposium on Plant-Soil Interactions at
Low pH, 2013, Oct. 18-22, Bengaluru,
India

- (11) 山地直樹 他、イネの OsHMA2 による
亜鉛およびカドミウムの選択的分配機構、日
本土壌肥料学会、2012 年 9 月 4-6 日、鳥取
大学
- (12) 佐々木明正 他、OsNramp3 によるマン
ガン分配制御機構、日本本土壌肥料学会、2012
年 9 月 4-6 日、鳥取大学
- (13) 山地直樹 他、OsNramp3 によるイネの
選択的マンガンの分配機構、日本植物生理学会、
2012 年 3 月 16-18、京都産業大学
- (14) 山地直樹 他、イネのマンガンの分配に関
与する OsNramp3 の機能解析、日本本土壌肥
料学会、2011 年 8 月 8-10 日、筑波大学
- (15) Yamaji, N. et al., Transporters
involved in preferential distribution of Si
to the panicles at the node in rice. 5th
International Conference on Silicon in
Agriculture, 2011, Sep. 13-18, Beijing,
China
- (16) Yamaji, N., Ma, J.F. Novel findings of
efficient mineral distribution mechanisms
in rice node. International Symposium
“Strategies of Plants against Global
Environmental Change”, 2011, Dec. 8-10,
Kurashiki, Japan
- (17) Zheng, L.Q. et al., OsYSL16 is a
phloem-localized transporter for Cu
distribution in rice. International
Symposium “Strategies of Plants against
Global Environmental Change”, 2011, Dec.
8-10, Kurashiki, Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

- 山陽新聞 2013 年 10 月 27 日
「植物生育へマンガンの供給 調節タンパク
質発見」
- 日刊工業新聞 2013 年 9 月 24 日
「植物の栄養分分配の仕組み 岡山大が一
端解明」
- 日本経済新聞 2013 年 5 月 14 日
「イネのたんぱく質 亜鉛を振り分け」
- 山陽新聞 2013 年 5 月 16 日
「植物成長促す遺伝子 働き高め収量拡大
も」

6. 研究組織

(1)研究代表者

山地 直樹 (YAMAJI NAOKI)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：00444646